

PATENT
ATTORNEY DOCKET: 58777.000013

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
Kenju MIURA et al.) Group Art Unit: 1646
Application Number: 10/649,952) Examiner: Unassigned
Filed: August 28, 2003)
For: PROMOTERS OF THE GROWTH AND/OR DIFFERENTIATION OF
HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND/OR HEMATOPOIETIC PROGENITORS

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Mail Stop Patent Application

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

Applicants are enclosing a certified copy of Japanese Patent Application No. 400330/2001, filed in Japan on December 28, 2001. This document provides a basis for Applicants' claim for priority.

No fee is believed due as a result of this submission. However, if a fee is due upon the filing of this priority document, please charge the undersigned's Deposit Account No. 50-0206.

Respectfully submitted,

Date: March 1, 2004

By:

Robert M. Schulman
Registration No. 31,196

David H. Milligan
Registration No. 42,893

HUNTON & WILLIAMS LLP
Intellectual Property Department
1900 K Street, N.W., Suite 1200
Washington, DC 20006-1109
(202) 955-1500 (telephone)
(202) 778-2201 (facsimile)

RMS/DHM/cbt

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2001年12月28日
Date of Application:

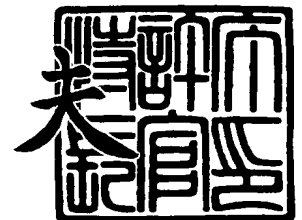
出願番号 特願2001-400330
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2001-400330]

出願人
Applicant(s): サントリー株式会社
株式会社第一サントリー生物医学研究所

2003年12月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康



出証番号 出証特2003-3104791

【書類名】 特許願

【整理番号】 012986

【提出日】 平成13年12月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N
A61K

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 株式会社サ
ントリー生物医学研究所内

【氏名】 三浦 健寿

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 株式会社サ
ントリー生物医学研究所内

【氏名】 春山 宗忠

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 株式会社サ
ントリー生物医学研究所内

【氏名】 児玉 志保

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 500422182

【氏名又は名称】 株式会社サントリー生物医学研究所

【代理人】**【識別番号】** 100089705**【住所又は居所】** 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所**【弁理士】****【氏名又は名称】** 社本 一夫**【電話番号】** 03-3270-6641**【選任した代理人】****【識別番号】** 100071124**【弁理士】****【氏名又は名称】** 今井 庄亮**【選任した代理人】****【識別番号】** 100076691**【弁理士】****【氏名又は名称】** 増井 忠弐**【選任した代理人】****【識別番号】** 100075270**【弁理士】****【氏名又は名称】** 小林 泰**【選任した代理人】****【識別番号】** 100096013**【弁理士】****【氏名又は名称】** 富田 博行**【選任した代理人】****【識別番号】** 100091638**【弁理士】****【氏名又は名称】** 江尻 ひろ子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706781

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コフィリンを有効成分とする、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 2】 コフィリンが、SEQ ID NO: 1に示すアミノ酸配列、あるいはSEQ ID NO: 1に示されるコフィリンのアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換および／または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有するものである、請求項1に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 3】 コフィリンが、SEQ ID NO: 1に示すアミノ酸配列、あるいはSEQ ID NO: 1に示されるコフィリンのアミノ酸配列をコードする塩基配列と相補的な塩基配列との間で、ストリンジントな条件下においてハイブリダイズする塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有するものである、請求項1に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 4】 コフィリンが、SEQ ID NO: 1に示すアミノ酸配列、あるいはコフィリンのアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1) との間で少なくとも30%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する、請求項1に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 5】 コフィリンが、SEQ ID NO: 2に示す塩基配列、あるいはSEQ ID NO: 2に示されるコフィリンの塩基配列と相補的な塩基配列との間で、ストリンジントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列によりコードされ、かつ造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有するものである、請求項1に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞

の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 6】 コフィリンが、SEQ ID NO: 2に示す塩基配列、あるいはSEQ ID NO: 2に示されるコフィリンの塩基配列との間で少なくとも30%の塩基配列相同性を有する塩基配列を含むDNAによりコードされ、かつ造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有するものである、請求項1に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 7】 コフィリンが遺伝子組換えの手法により産生されたものである、請求項1～6のいずれか1項に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 8】 コフィリンが糖鎖を有する、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 9】 他のサイトカインをさらに含有してなる、請求項1～8のいずれか1項に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 10】 前記サイトカインが、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-11、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、エリスロポエチン (EPO)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、上皮増殖因子 (EGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、トランスフォーミング成長因子- α (TGF- α)、プロテアーゼネキシンI、プロテアーゼネキシンII、血小板由来成長因子 (PDGF)、コリン作動性分化因子または白血球遊走阻止因子 (LIF) からなる群から選ばれた少なくとも1種である、請求項11に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 11】 前記他のサイトカインがIL-3である、請求項9に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 12】 汎造血細胞減少および／または造血機能低下を伴う疾患の

治療のための、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 13】 再生医療用治療に用いることができる、請求項1～12のいずれか1項に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤。

【請求項 14】 請求項1～12のいずれか1項に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の少なくとも1種を投与することを含む、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化を促進する方法。

【請求項 15】 請求項1～12のいずれか1項に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の少なくとも1種を投与することを含む、造血幹細胞を生体外で増殖させる方法。

【請求項 16】 請求項1～12のいずれか1項に記載の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の少なくとも1種を投与し、造血幹細胞を生体外で増殖させることによる再生医療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アクチン結合タンパク質の1種であるコフィリンまたはその類縁化合物を有効成分とする造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤とその新たな用途に関する。本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤は、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化が十分でないために生じる疾患、特に汎造血細胞減少症および／または造血機能低下を伴う疾患の治療薬として有用である。また、本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を投与することを含む、造血幹細胞を生体外で増殖させる方法は、造血幹細胞移植や遺伝子治療にも有用であり、さらに再生医療にとって有用なものである。

【0002】

【従来の技術】

生体における成熟・分化した末梢血球系の恒常性は、自己複製能を有する造血幹細胞、それから供給され分化の方向が決定づけられた造血前駆細胞および両者間の連続的な分化段階の細胞群と、さらにはそれら一連の細胞を取り巻く造血微小環境としての支持間質細胞との直接相互作用あるいは後者の分泌する液性造血調節因子との間接相互作用により調節されている。造血幹細胞から造血前駆細胞を経て、成熟した各種血球への増殖および／または分化には、多数のサイトカインの関与が明らかにされている。

【0003】

遺伝子工学の進歩により、これらのサイトカインの遺伝子はクローニングされ、遺伝子組み換え技術により工業生産も可能となっている。遺伝子組み換え型造血因子としては、顆粒球-コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor、以下「G-CSF」という) およびマクロファージ-コロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor、以下「M-CSF」という) が放射線照射または化学療法などによる造血機能低下 (好中球減少など) に対する治療薬として、エリスロポエチン (erythropoietin、以下「EPO」という) が腎性貧血などの治療薬として臨床応用されている。しかし、これらの造血因子での治療は、一過性に成熟血球の回復をきたすに過ぎない。

【0004】

そこで、根本的な造血機能の改善の治療手段として、自己あるいは同種造血幹細胞移植が行われている。最近では、末梢血造血幹細胞移植が急速に普及しつつあり、また、臍帯血造血幹細胞移植が注目されている。しかし、課題も多く、とくに造血幹細胞は非常に僅かな存在であるためドナーおよび／あるいはレシピエントの負担も大きい。そのため、造血幹細胞の体外増幅法の確立が必要である。また、現在効果的な治療法のない致死的な遺伝性疾患や、ある種の悪性腫瘍、エイズ患者に対して、欠失あるいは、変異遺伝子を相補する遺伝子治療が試みられている (大橋十也、実験医学、12:333, 1994)。

【0005】

このような遺伝子治療において、造血幹細胞は恒久的に生存し得ることから、

最適な標的細胞と考えられている。しかし、目的遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを効率よくトランスフェクトあるいは感染させるには、通常静止期にある少数の造血幹細胞を細胞周期に入れ、増幅させることが必要である。しかしながら、造血幹細胞の体外増幅が期待されているSCF (stem cell factor) やflk-2/flt3リガンドも単独では増幅活性が低く、TPO (thrombopoietin)、インターロイキン6/可溶性インターロイキン6受容体複合体等との組み合わせが検討されている。さらに、増幅活性の強い新たな因子の解明、取得が待たれている。なお、SCFは造血幹細胞や造血前駆細胞に発現しているチロシンキナーゼ型受容体であるc-kitのリガンドであることが明らかとなった (Cell, 63: 167-174, 1990; Cell, 63: 195-201, 1990; Cell, 63: 225-233, 1990)。c-kit/SCF系シグナルが造血幹細胞や造血前駆細胞の増殖にとって重要なことは実験的研究により明らかである (Blood, 78: 1-19, 1991; Blood, 81: 2844-2853, 1993; Blood, 90: 4767-4778, 1997)。しかし、ヒト造血幹細胞や造血前駆細胞上のc-kitの発現は弱く (Blood, 87: 4136-4142, 1996)、これらの細胞の増殖法としては種々のサイトカインとの組み合わせが理想的であると考えられている (Blood, 89: 2644-2653, 1997; Cancer Chemother. Pharmacol., 38 [Suppl.]: 64-68, 1996)。

【0006】

一方、本発明者は、ヒト骨髓性白血病細胞株から、CD34が陽性であり、かつGP (glycoprotein) IIb/IIIaが陰性であるという特徴を有する、新たな細胞株を樹立した (特開平6-269284)。CD34は、造血幹細胞の分化に伴い消失する糖タンパク質でヒト造血幹細胞のマーカーであり、一方GP (glycoprotein) IIb/IIIaは、血小板と巨核球に特異的に発現している血小板膜糖タンパク質で、巨核球の分化に伴い増強される分化抗原でありヒト巨核球のマーカーである。本発明者らはこの細胞を、Human myeloid leukemic cell S6 SBM332と命名し (以下「S6細胞」と称す)、1993年3月9日付けで日本国茨城県つくば市東1-1-1の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託センター) にFERM BP-4227として寄託した。

【0007】

S6細胞株は、血清添加条件でCD34陽性およびGPIIb/IIIa陰性の表現型を保持したまま長期的に安定して培養でき、しかも12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート（TPA）の添加培養によりCD34の発現が減弱し、GPIIb/IIIaの発現が著しく増強し、これによってS6細胞株は巨核球系へ分化することがわかり、分化能を有することも明らかとなった。

【0008】

一方コフィリンは、分子量約19000のタンパク質であり、種々のシグナルに対しアクチンフィラメント（F-アクチン）に1：1のモル比で結合し、その結果、アクチンの物理的状态を調節して、アクチン系細胞骨格の再構築において主要な機能を果している、アクチン結合タンパク質（actin-binding protein；ABP）の一員である（実験医学、第12巻、第4号：24-28，1994）。そしてコフィリンは、G-アクチンと結合しG-アクチン（アクチン単量体）を切断、脱重合することにより、形態変化、移動（運動）、分裂、分泌、食（飲）作用、各種シグナル伝達等の多くの細胞応答を制御していることが知られている（生化学、第71巻、第2号：101-114，1999）。コフィリンは、細胞内でリン酸化型と脱リン酸化型が共存しており、アクチンに対する結合活性は、リン酸化によって抑制され、脱リン酸化により促進される。

【0009】

近年、血小板に対するトロンビンによる刺激、甲状腺細胞に対する甲状腺刺激ホルモンによる刺激、耳下腺細胞に対するイソプレテレノールによる刺激、アストロサイトに対するジブチルcAMPによる刺激など、さまざまな外的刺激に伴いコフィリンが脱リン酸化されることが分かってきた（Moon, A. & Drubin, D.G. (1995) Mol. Biol. Cell. 6, 1423-1431）。さらに、好中球やT細胞の活性化に伴ってコフィリンが脱リン酸化されるという報告もある。

【0010】

一方、アクチン結合タンパク質（ABP）の機能あるいはABP機能の調節により、ある種の疾患治療法が提示されている。例えば、アクチン沈着が原因となる病態組織、臓器へのABP投与による治療あるいは病態軽減法（特表平5-50603号、特表平8-510998号）、コフィリンの脱リン酸化抑制剤によるアポトーシスモジュレー

ションを機序としたアポトーシス制御不全が関与する各種疾患治療薬（特開平10-67662号、特開平10-87484号）が挙げられる。

【0011】

しかしながら、これらコフィリンおよびその類縁化合物が造血幹細胞およびまたは造血前駆細胞の増殖および／または分化に関与するとの報告はこれまでのところ存在しなかった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化が十分でないために生じる疾患、特に汎造血細胞減少症および／または造血機能低下を伴う疾患の治療薬として有用である、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を提供することを課題とする。また、本発明は、造血幹細胞移植、遺伝子治療および再生医療にも有用である、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を投与することを含む、造血幹細胞の生体外増殖方法を提供することを課題とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明の発明者らの研究において、S6細胞の無血清培養上清中にはマウス高増殖能コロニー形成細胞、HPP-CFC (high proliferative potential-colony forming cells) の増幅を促進する因子の存在が認められた。従来からの知見およびこの研究結果から、S6細胞は造血幹細胞の性質を有し、造血幹細胞の増殖を促進し得る未知の因子（以下「S6因子」と称す）によりオートクリン増殖していることを見いだした。すなわち、S6因子は新規な、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖因子である可能性が示唆された。これに基づいてS6細胞の無タンパク質培養上清を精製し、HPP-CFC増幅能を有する因子の分離精製及び構造の決定、ないし該因子の遺伝子のクローニング及び遺伝子組み換え型因子のHPP-CFC増幅能に関して鋭意研究を重ねた結果、意外にも該因子が低分子アクチン結合タンパク質であるコフィリンであることを見出した。

【0014】

そして本発明の発明者らは、この知見から、アクチン結合タンパク質の一つであるコフィリンが造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化を促進することができる因子であることを見だし、マウスのHPP-CFC増幅を促進させ、しかも、HPP-CFC増幅能を有する既存のサイトカインよりも、その活性が著しく高いという知見に基づいて本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、コフィリンを有効成分とする、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤に関する。

【0015】

本発明におけるコフィリンの造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性は、HPP-CFCの増幅促進活性（以下「HPP-CFC活性」と称す）を指標として、決定することができる。HPP-CFC活性とは、HPP-CFC (high proliferative potential-colony forming cells) に作用し、その増幅を促進する活性のことをいう。このHPP-CFC (high proliferative potential-colony forming cells) は、増殖力が強く巨大コロニー形成能を有する、in vitroコロニー形成法で確認できる最も未熟な細胞であり、骨髓細胞を骨髓間質細胞上で5週間以上培養した後でもコロニー形成能を有する細胞として検出される長期培養開始細胞 (long term culture-initiating cell、LTC-IC) より一段階分化したものと考えられている。

【0016】

HPP-CFCコロニー形成促進活性の測定は、たとえば、造血幹細胞を特異的に取得する目的でマウスに抗がん剤である5-フルオロウラシルを投与し、このマウスから得た骨髓細胞から、さらにT細胞、B細胞、顆粒球およびマクロファージのマーカー抗原を発現している細胞を除去した造血幹細胞画分に、サンプルおよび／またはサイトカインを添加して液体培養し、その培養液の一部をコロニーアッセイに供することにより形成される巨大なHPP-CFCコロニー数を測定することにより行う。この測定法により、本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の活性を測定することができる。

【0017】

本発明において、コフィリンを用いて上述したHPP-CFC活性測定を行ったとこ

ろ、コフィリンは、このようなHPP-CFCに働いて、その増殖および／または分化を誘導する活性を発揮することがわかった。したがって、コフィリンは、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化の非常に初期段階にある細胞（すなわち多能性幹細胞）に機能し、その増殖および／または分化を促進する活性を有している。

【0018】

本発明において「造血幹細胞」とは、赤血球、白血球、血小板などの全ての血液細胞に分化することができる、多能性幹細胞のことをいう。この細胞は、CD34陽性であるが、他の細胞系譜マーカー（Lineage maker）は全て陰性な細胞である。

【0019】

本発明において「造血前駆細胞」とは、造血幹細胞より分化段階が進み、それぞれの血液細胞系列の前駆細胞（単能性前駆細胞）へ分化する未分化前駆細胞のことをいう。

【0020】

本発明において造血幹細胞および／または造血前駆細胞の「分化」という用語は、造血幹細胞が造血前駆細胞へ、造血前駆細胞が単能性造血前駆細胞および／または特有の機能を有する細胞、すなわち赤血球、白血球、巨核球などの成熟細胞に転換することをいう。

【0021】

したがって、本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞増殖促進活性とは、上述した機能を有する造血幹細胞および／または造血前駆細胞を増殖させて、同様の機能を有する造血幹細胞および／または造血前駆細胞を増幅する活性のことをいう。また、本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞分化促進活性とは、造血幹細胞および／または造血前駆細胞を分化させて、上述した機能を有する造血前駆細胞や単能性前駆細胞および／または成熟血液細胞（赤血球、白血球、巨核球）に転換する活性のことをいう。本発明においては、HPP-CPCを造血幹細胞および／または造血前駆細胞と同義で使用する。

【0022】

切断因子の一例であるコフィリンは、真核生物に普遍的に存在する分子量が15-21 kDaの低分子アクチン結合タンパク質であり、高等脊椎動物のコフィリンはいずれも166個のアミノ酸からなる。そして、そのアミノ酸配列は系統樹的に離れた種間でも全長にわたって30%以上の相同性があり、たとえば、ヒトのコフィリンには筋型コフィリンと非筋型コフィリンとが存在するが、これらの相同性は76.5%であることが知られている。したがって、本発明において特に限定なく「コフィリン」という場合には、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を有するコフィリンの他、その類縁化合物も含まれる。

【0023】

本発明においてコフィリンの類縁化合物という場合には、SEQ ID NO: 1に示されるコフィリンのアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換および／または付加されたアミノ酸配列からなるもの；SEQ ID NO: 1に示されるコフィリンのアミノ酸配列をコードする塩基配列と相補的な塩基配列との間で、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有するもの；コフィリンのアミノ酸配列（SEQ ID NO: 1）との間で少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも70%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸配列からなるもの；であって、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有するもの、が含まれる。本発明においてコフィリンの類縁化合物という場合には、また、SEQ ID NO: 2に示されるコフィリンの塩基配列と相補的な塩基配列との間で、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列によりコードされるもの；SEQ ID NO: 2に示されるコフィリンの塩基配列との間で少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも70%の塩基配列相同性を有する塩基配列を含むDNAによりコードされるもの；であって、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有するもの、も含まれる。

【0024】

ここにおいて、「1もしくは複数個」とは、好ましくは1～20個、より好ましく

は1~10個、最も好ましくは1~5個のことをいう。また、タンパク質の場合、「欠失」、「置換」、「付加」は、コフィリン (SEQ ID NO: 1) と同様に造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有するように生じるもののことをいう。例えば、アミノ酸の「置換」の場合には、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換、例えばある疎水性アミノ酸から別の疎水性アミノ酸への置換、ある親水性アミノ酸から別の親水性アミノ酸への置換、ある酸性アミノ酸から別の酸性アミノ酸への置換、あるいはある塩基性アミノ酸から別の塩基性アミノ酸への置換、などの置換が含まれる。

【0025】

本発明において、ストリンジェントな条件とは、目的の塩基配列が、コフィリン (SEQ ID NO: 1) をコードする塩基配列 (例えば、SEQ ID NO: 2) もしくはこれと縮重の関係にある塩基配列との間で、特異的にハイブリダイズ可能である条件をいう。ハイブリダイズ条件は、温度、イオン濃度などの条件を考慮して決定されるが、一般的には温度が高いほど、またイオン濃度が低いほどストリンジェントな程度が高くなることが知られている。このようなストリンジェントな条件の設定は、当業者であれば、例えば、SambrookおよびRussel (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (2001)) の記載に基づいて行うことができる。これらのストリンジェントな条件の具体的な例としては、例えば、6×SSC、5×Denhardt's、0.1% SDS、25℃ないし68℃などのハイブリダイゼーション条件を使用することが考えられる。この場合、ハイブリダイゼーションの温度としては、より好ましくは45℃ないし68℃ (ホルムアミド無し) または25℃ないし50℃ (50%ホルムアミド) を挙げることができる。

【0026】

本発明においてアミノ酸あるいは塩基配列の配列相同性は、視覚的検査及び数学的計算により決定してもよい。あるいは、2つのタンパク質配列の配列相同性は、NeedlemanおよびWunsch (J. Mol Biol., 48: 443-453, 1970) のアルゴリズムに基づき、そしてウイスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UWGCG) より入手可能なGAPコンピュータープログラムを用い配列情報を比較することにより、決定してもよい。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターに

は: (1) HenikoffおよびHenikoff (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919, 1992) に記載されるような、スコアリング・マトリックス、blosun62; (2) 12のギャップ加重; (3) 4のギャップ長加重; および (4) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。

【0027】

本発明においてアミノ酸あるいは塩基配列の配列相同性解析には、当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、用いてもよい。例えばAltschulら (Nucl. Acids. Res. 25., p. 3389-3402, 1997) に記載されているBLASTプログラムを用いて配列情報と比較し決定することが可能である。具体的には、塩基配列解析の場合、Nucleotide BLAST (BLASTN) プログラムで、Query塩基配列を入力して、GenBank、EMBL、DDBJなどの塩基配列データベースと照合することができる。また、アミノ酸配列解析の場合、Protein BLAST (BLASTP) プログラムで、Queryアミノ酸配列を入力して、GenBank CDS、PDB、SwissProt、PIRなどのアミノ酸配列データベースと照合することができる。当該プログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI)、あるいはDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイトから利用することが可能である。BLASTプログラムによる相同性検索の各種条件 (パラメーター) は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、用いてもよい。

【0028】

このようなコフィリンおよびその類縁化合物は、天然のものを使用するほか、本発明の技術分野において既知の遺伝子工学的方法により製造することができるもの、たとえば部位特異的変異生成 (Site Directed Mutagenesis)、変異原処理やPCR増幅ミスを用いたランダム変異生成 (Random Mutagenesis)、カセット導入変異生成 (Cassette Mutagenesis) などにより製造されるもの、を用いることができる。すなわち、変異は自然に生じたものであっても、遺伝子工学的手法によって施したものであってもよい。たとえば、コフィリンについてはアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1) および遺伝子配列 (SEQ ID NO: 2) は既知であることから

、これらの配列に基づいて、確立されている遺伝子工学的手法により產生することもできる。ここにおいて、遺伝子工学的手法としては、たとえば、SambrookおよびRussel (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (2001)) に記載されている方法を使用することができる。当業者は、慣用された方法により容易にこのような変異タンパク質を作製することができる。

【0029】

コフィリンは生物種によりいくつかの異なる名称で呼ばれており、通常、それらはコフィリンファミリーと総称されている。本発明においては、これらのコフィリンファミリーに属する様々な生物種由来のものを含めて、コフィリンと総称する。したがって、コフィリンには、コフィリンと命名されているものの他、例えば、ブタのデストリン、ニワトリのアクチン脱重合因子 (ADF)、ウニ卵のデパクチン、酵母のAbp1、Acanthamoebaのアクトフォリン等およびこれらの類縁化合物が含まれる。

【0030】

コフィリンの活性を有する物質の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤としての活性の種特異性は、マウス由来のコフィリンがヒト細胞に対して効果を発揮するなど、厳密な種特異性は有していない。従って、本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の有効成分としては、コフィリンだけでなく、コフィリンと同様の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する限り、特定の種由来である必要はなく、たとえばウシ、ブタ、トリ、ヤギ、ヒツジなどの動物に由来するものであってもよい。しかし、ヒトに使用する場合にはヒト由来のコフィリンあるいは当該コフィリンの類縁化合物を用いることが好ましい。

【0031】

本発明の一態様においてはさらに、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤にはコフィリンまたはその類縁化合物以外に、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化を促進する働きを有する種々のサイトカインを1種類以上、補助的有效成分として含有させるこ

ともできる。

【0032】

本発明において補助的有効成分として追加することができるサイトカインの例としては、インターロイキン (IL) -1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-11、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、エリスロポエチン (EPO)、ステムセルファクター (SCF)、flk-2/flt3リガンド、トロンボポエチン (TPO)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、インスリン様増殖因子、上皮増殖因子 (EGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、トランスフォーミング成長因子- α (TGF- α)、プロテアーゼネキシンI、プロテアーゼネキシンII、血小板由来成長因子 (PDGF)、コリン作動性分化因子 (CDF)、白血球遊走阻止因子 (LIF) 等があるが、これらに限られるわけではない。また、IL-6/可溶性IL-6受容体複合体を含有させることもできる。

【0033】

これらのサイトカインを補助的有効成分として含有させると造血幹細胞および/または造血前駆細胞の増殖および/または分化促進剤としての効果は相乗的に増加する。これらの添加量は特に限定しないが、例えば、ヒトコフィリンを100とした場合にそれぞれ0.0001~200000重量%添加することができる。これらの補助的有効成分の添加量は上述の値に限定されるものでなく、症状、患者の年齢等により適宜決定することができる。これらのサイトカインは必ずしもコフィリンと同時に同じ剤形として投与しなくてもよく、たとえば、コフィリンを投与した後にサイトカインを投与することもできる。

【0034】

本発明の一態様においては、上述した造血幹細胞および/または造血前駆細胞の増殖および/または分化促進剤に対して、コフィリン以外のHPP-CFC活性を有する物質を、さらなる補助的有効成分として添加して使用してもよい。さらなる補助的有効成分としてのコフィリン以外のHPP-CFC活性を有する物質とは、HPP-CFC由来コロニーの形成を促進することにより、造血幹細胞および/または造血前

駆細胞の増殖および／または分化促進作用を有する物質であって、コフィリン以外のもののことをいう。コフィリンとこれらのさらなる補助的有効成分とを同時に投与することにより、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進作用を相乗的に亢進することができる。このような物質にはSCF、Flk2／Flt3リガンド、TPO、IL-6／s IL-6Rなどが含まれるが、これらのものには限定されない。

【0035】

本発明のコフィリンを有効成分とする、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤は、体内に投与された際のその機能に基づいて、汎造血細胞減少および／または造血機能低下を伴う疾患、より具体的には造血細胞減少あるいは造血機能障害を伴う疾患の治療および／または造血細胞減少あるいは造血機能障害を伴う治療法の改善に有効である。上記例としては、Fancioli症候群、再生不良性貧血、悪性リンパ腫瘍もしくは急性白血病等の癌、慢性肝障害、腎不全、手術時若しくは保存血の大量輸血患者、重症感染症、骨髄障害性血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、STE、蛇咬症、溶血性尿毒症性症候群、脾機能亢進症、出血、Barnard-Soulier症候群、Glanzmann's血小板無力症、尿毒症、抗血小板抗体、骨髄増殖性疾患等がある。

【0036】

本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の投与は、限定するわけではないが、一般に非経口的に行われ、例えば静脈内、腹腔内、筋肉内などの経路から投与することができる。本発明においては、静脈内投与することが好ましい。

【0037】

本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の治療または改善薬としての使用量は、その使用方法、使用目的等により異なるが、例えば、ヒトコフィリンのタンパク質量として、注射投与して用いる場合には、例えば、1日量約0.002 μ g/kg～20 mg/kgを投与するのが好ましく、より好ましくは、1日量約0.2 μ g/kg～2 mg/kgである。

【0038】

本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤は、液体あるいは固体として調製することができる。

本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を液体として調製する場合には、コフィリンを水性溶剤（例えば、蒸留水）、水溶性溶剤（例えば、生理食塩水、リンゲル液）、油性溶剤（例えば、ゴマ油、オリーブ油）等の溶剤に溶解して、慣用の方法により調製できる。さらに所望により溶解補助剤（例えば、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム）、緩衝剤（例えば、クエン酸ナトリウム、グリシン）、等張化剤（例えば、ブドウ糖、転化糖）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン）等の添加剤を加えることもできる。また、該水溶液におけるpHは、約3～8に、さらに好ましくは約5～7に調整される。上記pH範囲に調整するためには、例えば希酸（例えば、希塩酸）や希アルカリ（例えば、希水酸化ナトリウム、希炭酸水素ナトリウム）等を添加することにより行える。

【0039】

本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の製剤化にあたり、コフィリンを含有する液剤に、安定剤としてヒト血清アルブミン（HSA）を配合すると、溶液状態でpH 3～8を示すように調整することができる。このようにすると、保存中および凍結や凍結乾燥操作におけるコフィリンの活性低下が少なく、また凍結品においてはその再溶解時の溶状が透明であるので好ましい。HSAとしては、いかなるものでもよいが、本組成物を臨床応用するためには、非経口投与に用いる程度の品質のものが好ましい。例えば、健康人血漿を原料としてCohnのエタノール分画第6法によって分画精製したものが用いられる。また、安定剤として、アセチルトリプトファンナトリウムや、カプリル酸ナトリウムを含むものであってもよい。HSAは、各成分を水溶液とした場合に、水溶液1 mlあたり約0.1 mg～約50 mg、特に、約0.5 mg～約20 mg含有させることが好ましい。

【0040】

本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤の製剤化にあたっては、コフィリンを含有する液剤に、前記HSAに加えさらに、例えば、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、プロリン等のアミノ酸、特にモノアミノ脂肪酸アミノ酸、もしくは環状アミノ酸、ブドウ糖、マンノース等の単糖類、ソルビット、マンニット等の糖アルコール類、およびこれらの生理学的に許容される塩、ならびにこれらの誘導体からなるグループから選択される化合物の1種類または2種類以上を配合してもよい。上記配合剤は、例えば、コフィリンを水溶液とした場合に、水溶液1 ml当たり、単糖類または糖アルコール類の場合は約10～100 mg、アミノ酸の場合は約5～50 mg配合することが好ましい。上記の製剤化にあたっては、水溶液を溶液状態でpH約3～8、好ましくはpH約5～7を示すように調整する。グルタミン酸等の酸性アミノ酸を配合する場合は該物質を上記所定量加えることにより、所定のpHに調整できる。あるいは、所望により、または上記酸性アミノ酸を配合しない場合は塩酸、リン酸等の鉱酸、もしくはコハク酸、酒石酸、クエン酸等の緩衝剤で所定のpHに調整できる。

【0041】

また、本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を固体として調製する場合は、例えば、コフィリンを凍結することにより、あるいは凍結乾燥することにより調製することができる。特に、取り扱いや貯蔵の安定性の面から凍結乾燥することが好ましい。本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を凍結することにより調製するためには、水溶液として調製した造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を原料として用い、これを通常約-80℃～-20℃で凍結することにより製造できる。該凍結組成物は約-80℃～25℃、好ましくは約-80℃～15℃、さらに好ましくは約-80℃～-10℃で保管する。本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を凍結乾燥することにより調製するためには、例えば上記凍結組成物を常法により減圧乾燥するか、または、上記水溶液もしくは上記凍結組成物の融解により得られる水溶液を、所望により小分けし、上述のように凍結した後、常法により減圧乾燥することにより製造することができる。

【0042】

本発明においては、場合により、固体（例えば、粉末状）のコフィリンに、希釈剤（例えば、蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖）、賦形剤（例えば、カルボキシメチルセルロース（CMC）、アルギン酸ナトリウム）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、フェノール）、無痛化剤（ブドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカイン）等を混合することができる。

【0043】

上述した固体の製剤を凍結乾燥することにより調製する場合には、さらにそれを用いて液剤を調製するために、用時適当な溶剤に溶解して使用することができる。より具体的には、上述した固体の製剤を、蒸留水もしくは生理食塩水等を用いて溶解し液剤として用いる。なお、所望により前記の単糖類、糖アルコール類、アミノ酸等を含有する、pH調整された溶解液で溶解した後に使用することもできる。

【0044】

本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を液剤としてあるいは凍結により製造する場合は、例えば、コフィリンを含有する水溶液を濾過等により滅菌することが好ましい。液剤として製造する場合にはこの水溶液を使用することができ、凍結により製造する場合にはこの水溶液を凍結することができる。

【0045】

本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を凍結乾燥により製造する場合は、例えば、コフィリンを含有する水溶液を濾過等により滅菌するか、この水溶液を濾過等により滅菌した後、無菌操作によりバイアル瓶等に分注小分けした後上記凍結乾燥処理に付すことが好ましい。この場合、容器の空間部を真空にするか、窒素ガス置換することにより、該組成物の安定性を高めることができる。また、アミノ酸や単糖類あるいは糖アルコール類を含有する水溶液で、凍結乾燥品を溶解する場合には、その水溶液は除菌濾過し、無菌操作によりアンプル等に分注小分け後、常法により蒸気滅菌したものをを用いることが好ましい。

【0046】

本発明のコフィリンを有効成分とする、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤は、上述したような薬理学的効果を発揮する結果、本発明の造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤はまた、再生医療用治療において使用することもできる。

【0047】

【発明の実施の形態】

(1) 造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の測定法

造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖の測定法として、細胞系譜マーカー (Lineage maker) を発現した細胞を除去したマウス骨髓細胞とサンプルとを液体培養した後、その培養液中に存在する高増殖能コロニー形成細胞 (High Proliferative Potential Colony Forming Cell ; HPP-CFC) 数を測定する方法を用いる。HPP-CFCを指標としたアッセイ系は広く造血幹細胞の研究に用いられている。たとえば、造血幹細胞に作用する幹細胞因子 (Stem Cell Factor ; SCF) はHPP-CFCを指標にして精製されている。

【0048】

(2) 造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の精製

造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の精製は、例えば、S6細胞の無タンパク質培養上清 (600 L) および細胞を出発原料とし、分子量10000のUF膜により分離する限外ろ過濃縮 (18 L) 後、50%硫酸上清、フェニル-セファロース (Amersham Pharmacia Biotech K.K.)、ヘパリン-セファロース (Amersham Pharmacia Biotech K.K.)、キレート-セファロース (Amersham Pharmacia Biotech K.K.)、MonoS (Amersham Pharmacia Biotech K.K.)、ゲルろ過などの各カラムクロマトグラフィーを順次組み合わせることにより行うことができる。タンパク質はA280 nm、Lowry法による定量、SDS-PAGEにて確認する。

【0049】

(3) 造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の構造決定

造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の構造決定には、タンパク質の限定分解で生じる複数のペプチド断片の分子量値、および、その衝突解離によって生じる分子量値によってタンパク質／核酸配列データベースを検索し、もとのタンパク質を同定する方法を用いる。この方法は、質量分析計や質量分析法の発展によりのタンパク質やペプチドから、その分子量を高い精度で測定できるようになったこと、ゲノムプロジェクトなどにより大量のタンパク質／核酸配列データが蓄積されたこと、大量のデータを高速で処理するコンピュータ技術が発展したことを技術的な背景としており、10 ng程度以上の微量の試料を簡単な操作で処理することで、未知のタンパク質を迅速かつ確実に同定できる利点を持っている。

【0050】

(4) HPP-CFC活性の測定方法

HPP-CFC活性の測定は、造血幹細胞を特異的に取得する目的でマウスに抗がん剤である5-フルオロウラシルを投与したマウスから得た骨髓細胞から、さらにT細胞、B細胞、顆粒球およびマクロファージのマーカー抗原を発現している細胞を除去した造血幹細胞画分に、サンプルおよびサイトカインを添加して液体培養し、その培養液の一部をコロニーアッセイに供することにより形成される巨大なHPP-CFCコロニー数を測定することにより行う。

【0051】

本明細書において、塩基、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号または当該分野における慣用略号に基づく。

【0052】

明細書の以下に、実施例を記載する。この実施例は、本発明をより詳細に説明するためのものであり、本発明の範囲を限定することを目的とするものではない。

【0053】

【実施例】**実施例1：造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の精製、同定****(1) ヒトS6細胞の調製**

ヒトS6細胞を750 cm²の培養面積を持つローラーボトル (Corning, 430851) で培養した。すなわち、ローラーボトルあたり1×10⁸細胞を植え、10%ウシ胎児血清 (FBS、Hyclone社) を含むF-12培地 (Flow Laboratories) 500 mlを用いて、37℃、0.5 rpmで72時間培養した。72時間培養後、培養上清を遠心操作により取り除き、リン酸緩衝化塩類溶液 (Phosphate buffered saline: PBS、日水製薬) で3回洗浄した。洗浄後、遠心操作で上清を取り除いた細胞ペレットを-20℃で凍結保存した。

【0054】**(2) マウス骨髓細胞による造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の測定**

造血幹細胞を特異的に取得する目的でマウスに抗がん剤である5-フルオロウラシル (KYOWA HAKKO KOGYO Co., Ltd) を投与したマウスから得た骨髓細胞から、さらにT細胞、B細胞、顆粒球およびマクロファージのマーカー抗原を発現している細胞を除去した造血幹細胞に、サンプルおよびサイトカインを添加して液体培養し、その培養液の一部をコロニーアッセイに供することにより形成される巨大なHPP-CFCコロニー数を測定することにより、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の活性を測定した。以下、この測定法をHPP-CFCコロニー形成促進活性測定法という。

【0055】

具体的には、マウスBDF1 (メス、10～15週齢、日本チャールス・リバーより購入) に5-フルオロウラシル (150 mg/kg、i.v.) (KYOWA HAKKO KOGYO Co., Ltd) を投与し、2日後に大腿骨から骨髓細胞を採取した。採取した骨髓細胞をラット抗マウスCD4抗体 (CALTAG)、CD8抗体 (CALTAG)、B220抗体 (CEDERLANE)、Gr-1抗体 (CEDERLANE)、Mac-1抗体 (CALTAG) で標識した。これらラット抗体はすべてIgGを使用した。次にヤギ抗ラットIgG抗体標識ダイナビーズ (DYNAL) を

反応させた後、マグネットを用いてダイナビーズと結合した細胞を除去することにより、系譜マーカー (Lineage marker) 陰性な骨髓細胞 (Lin-BMCs) を得た。Lin-BMCsを10%FCS (Invitrogen) 添加 α MEM培地 (Invitrogen) で 2.5×10^4 cells/mlとなるように調整した。この細胞浮遊液にマウスIL-3 (最終濃度、10 ng/ml) (INTERGEN) を添加後、この細胞浮遊液を24穴プレート (Corning) の各ウエルに1 mlずつ加えた。ついで、各ウエルにサンプルを添加後、37℃、5%CO₂の条件下CO₂インキュベーター内にて培養した。培養6日目及び10日目に、各ウエル中の培養液を攪拌した後、そのうちの200 μ lを採取した。15 mlの遠心管チューブに、この採取した培養液200 μ lとFCS 1.5 ml (最終濃度30%)、BSA 0.5 ml (最終濃度1%) (ICN)、2-ME 50 μ l (最終濃度 1×10^{-4} M) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)、 α MEMで作成した2.5%メチルセルロース2 ml (最終濃度1%) (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.)、各造血因子50 μ l (マウスIL-3 (INTERGEN)、SCF (PeproTech)、ヒトIL-6 (PeproTech)、G-CSF (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)、M-CSF (株式会社ミドリ十字) : すべて最終濃度10 ng/ml)、 α MEM 0.5 mlとを混和し全量が5 mlとなるようにした。その後、20分間静置して泡を抜き、その1 mlを4枚の35 mm浮遊細胞培養用ディッシュ (Corning) に移した。9 cmシャーレに2つの35 mmディッシュを入れ、さらに蒸留水を入れたフタなし35 mmディッシュ1個を入れて、37℃、5%CO₂の条件下CO₂インキュベーター内で14日間培養した。直径2 mm以上のコロニーをHPP-CFCとしてその数を測定した。

【0056】

(3) 造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の精製

PBSにて洗浄し凍結保存した湿重量269 gのS6細胞に20 mM Tris/HClバッファー (pH7.0) を加えて、4℃にて、Potter-Elvehjem型テフロン (登録商標) ホモジナイザー (IWAKI GLASS CO., LTD.) にて破碎した。細胞残渣を遠心分離 (8000 rpm、20 min) にて除去した上清について50%飽和となるように硫酸アンモニウム (硫安) を添加した。その上清を2 M硫安/20 mM Tris/HClバッファー (pH 7.0) で平衡化したフェニル-セファロース (Amersham Pharmacia Biotech K.K.)

にかけ十分に洗浄した後、硫酸濃度を1.5 M、1 M、0.5 M、0 Mと段階的に下げることで各結合画分を溶出した。本因子、すなわち本明細書中で上述したS6因子、は主に1 M硫酸/20 mM Tris/HClバッファー (pH 7.0) 画分に溶出されていることを、(2) に記載のHPP-CFCコロニー形成促進活性測定法と同様な方法により確認した。

【0057】

フェニル-セファロースで得られた活性画分を0.6 M NaCl/20 mM Tris/HClバッファー (pH 7.0) に対して充分透析した後、同バッファーで平衡化したヘパリン-セファロースカラム (Amersham Pharmacia Biotech K.K.) にかけて洗浄後、2 M NaCl/20 mM Tris/HClバッファー (pH 7.0) で各結合画分を溶出した。このヘパリン溶出画分を20 mM Tris/HClバッファー (pH 7.0) で4倍希釈し、0.5 M NaCl/20 mM Tris/HClバッファー (pH 7.0) で平衡化した銅 (Cu) キレート-セファロースカラム (Amersham Pharmacia Biotech K.K.) に吸着させ、0.5 Mと0.3 M NaCl/20 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) での2段階で洗浄する事によりバッファー置換を行った。

【0058】

結合画分は0.1 Mイミダゾール/0.3 M NaCl/20 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) により溶出させ、そのまま0.4 M NaCl/20 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) で平衡化したMono Sイオン交換カラムにかけて流速0.7 ml/分にて0.4~2 MのNaClグラジエント溶出を行い、溶出液には終濃度0.1%となるように界面活性剤CHAPSを添加して保存した。HPP-CFC活性はフラクション47~50に認められたが、本画分中には目的とするS6因子とともに、塩基性-FGFが共存する事がELISAで確認された。ここでMono S活性画分を前半画分 (フラクション47、48) と後半画分 (フラクション49、50) の2画分に分けて、ヘパリンカラムでのグラジエントクロマトにより塩基性-FGFとの分離を試みた。0.4 M NaCl/20 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) /0.1%CHAPSで平衡化したヘパリン-セファロースカラムにかけた後、流速0.7 ml/分にて0.4~4 MのNaClグラジエント溶出を行った。

【0059】

Mono S活性前半画分からはフラクション30~32に活性が認められたが、ここには塩基性-FGFが存在する事がELISAにて確認され、本活性は塩基性-FGF由来である事が明らかとなった。

【0060】

一方、Mono S後半画分はフラクション30~32（塩基性-FGF画分）以外に、ELISAで塩基性-FGFが検出されないフラクション22、23にHPP-CFCコロニー形成促進活性が認められた。活性画分付近の各フラクションについて、ドーズアッセイおよび塩基性-FGF 1 ng/ml添加した系でのアッセイを行った。活性はフラクション22、23に容量依存的に認められ、液体培養6日目より10日目の方が高いHPP-CFCコロニー形成促進活性を示した。また、塩基性-FGF添加アッセイ系でもフラクション22、23に塩基性-FGF単独でのフル活性を超えるHPP-CFCコロニー形成促進活性が認められた。

【0061】

さらに活性を再確認するためにヘパリンカラムでグラジエント勾配を変えて再クロマトを行った。0.3 M NaCl/20 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) /0.1%CHAPSで平衡化したヘパリン-セファロースカラムにかけた後、0.3~2 MのNaClとグラジエント勾配を緩くして溶出を行った。HPP-CFCコロニー形成促進活性はフラクション25~27に認められ、本画分中には塩基性-FGFが存在しない事をELISA法で確認した。活性画分であるフラクション26で容量依存的に活性が認められ、塩基性-FGF添加アッセイ系でも塩基性-FGF単独での完全な活性を超えるHPP-CFCコロニー形成促進活性が認められた。また、活性画分中にはSDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析（ゲル濃度：10~20%グラジエント）により20 kDaのバンドが認められた。

【0062】

以上の各ステップにより、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析で20 kDaのバンドを示す画分がS6細胞120 Lから約0.4 μ g得られ、この画分はHPP-CFCコロニー形成促進活性が確認されたことから、本画分で観察された20 kDaバンドは造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質であることが明らかとなった。

【0063】

(4) 造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の性質

本発明における因子は下記の性質を有する。

【0064】

1 分子量: 約20 kDa (SDS-PAGE)

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析において20 kDa付近に1本のバンドとして検出され、還元、非還元条件による移動度の差はない。従って分子間ジスルフィド結合を有さない。

【0065】

2 等電点: 8.1 ± 0.5

AFB Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech K.K.) を使用した2次元電気泳動分析において、当該範囲にスポットとして検出される。

【0066】

(5) 造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質の構造決定

本因子について、以下の手順により、構造決定を試みた。

【0067】

MSおよびMS/MS測定のためのサンプル調製

本因子と判断した20 kDaバンドを含む精製画分を、12.5%アクリルアミドゲルによりSDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析後、0.1% CBB/40% MeOH/1% AcOHで染色した。20 kDaバンドを検出後、そのバンドを切り出し、40% MeOH/1% AcOHで脱色した。脱色したゲルを10 mM DTT/100 mM NH_4HCO_3 pH 8.7中で浸透し、56°C、1時間インキュベート後、55 mMヨードアセトアミドを添加し、暗室、45分インキュベートすることにより、本因子の還元アルキル化を行った。過剰の還元剤やアルキル化剤をゲルから除去後、150 ngトリプシン (Promega) /5 mM CaCl_2 /50 mM NH_4HCO_3 を添加し、ゲル内トリプシン消化を、37°C、18時間行った。反応終了後、ペプチド断片混合物を抽出し、スピードバック (Savant) により乾燥させた。0.05% TFAで溶解したペプチド断片混合物を、0.05% TFAで平衡化したPo

rosR2 (Perseptive Co. Ltd.) に供し、50%MeOH/0.2%FAで溶出させることにより脱塩した。脱塩したペプチド断片混合物を、質量分析 (MS) およびタンデム質量分析 (MS/MS) 測定のためのサンプル (調整済ペプチド断片化合物) とした。陰性対照として、サンプルバッファーのみでSDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析を行ったレーンのうち20 kDaバンドが検出すると考えられる部位を切り出し、本因子の場合と同様に調製した。記述した以外の詳細の操作は、Wilmらの方法に従って行った (Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. and Mann, M. Nature 379, 466-469, 1996)。

【0068】

MSおよびMS/MS解析による構造決定

本因子の構造決定には四重極直交加速飛行時間型質量分析計のQ-TOF (マイクロマス社) を用い、MSおよびMS/MS測定を操作指示書に従って行った。まず調製済ペプチド断片混合物と陰性対照について、それぞれMSによりm/z 100~1500の範囲を測定した。ペプチドの指標となる多価分子イオンについて両者で比較し、調製済ペプチド断片混合物に有意に検出した2価分子イオンを3つ確認した (表1)。

【0069】

【表1】

MS および MS/MS 解析で得られた主なイオン

分子イオン番号: 1

分子イオン: 583.82 (2 価)

分子イオン番号: 2

分子イオン: 669.39 (2 価)

プロダクトイオン (y ion): 712.43, 827.45, 990.51, 1103.60, 1174.66

プロダクトイオン (i ion): 86.08, 136.07

分子イオン番号: 3

分子イオン: 670.9 (2 価)

【0070】

次にこれら3つの2価分子イオンを個別に選択して、MS/MSを測定した。その結果、得られた主なプロダクトイオンの情報を基に、インターネット上に公開され

ているデータベース検索プログラムの1つ、ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu/mshome3.2.htm>) を用いて検索したところ、低分子量アクチン調節タンパク質として周知のヒト非筋型コフィリン (AC: P23528、pI 8.22、166 aa) がヒットした。本因子は、ヒト非筋型コフィリンと、分子量、等電点など挙動が類似している。

【0071】

しかしながら、このような解析のみから、本因子がヒト非筋型コフィリンであるということを確実に示すことは困難である。そこで、表1に記述した情報とヒト非筋型コフィリンの整合性をより厳密に調べるため、得られた情報から推測されるペプチド (表2) を合成し衝突解離スペクトルを測定することにより検証した。その結果、得られた情報全てが表1記載の情報と合致した。特筆すべき点として、得られた情報には表2に記載のN末端やC末端を含むペプチドに関する情報が含まれており、本因子のN末端とC末端がヒト非筋型コフィリンと同一であることが特定できた。以上のことから、本因子は、翻訳開始のメチオニンが除去され、それに続くアラニンがアセチル化し、それに続くセリンがリン酸化していない (アクチン調節という観点からは活性型の) ヒト非筋型コフィリンであると同定した (図1)。

【0072】

【表2】

データベース検索で推測された部分アミノ酸配列

分子イオン番号: 1 の情報により推測された N 末端を含むペプチド
(AcetN) ASGVAVSDGVIK+Na 付加

分子イオン番号: 2 の情報により推測されたペプチド
YALYDATYETK

分子イオン番号: 3 の情報により推測された C 末端を含むペプチド
LGSAVISLEGKPL

【0073】

実施例2: コフィリンの調製

(1) ヒトS6細胞株由来のcDNA ライブラリーの作製

無血清培地F12 (Invitrogen) を入れたローラボトルにて4日間培養したS6細胞 (1.2×10^8 細胞) より、FastTrack mRNA Isolation Kit (インビトロジェン社) を用いて、 $37 \mu\text{g}$ のS6細胞-polyA RNAを調製した。その $5 \mu\text{g}$ のS6細胞-polyA RNAより、TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech K.K.) とDirectional Cloning Toolbox (Amersham Pharmacia Biotech K.K.) を用いて、EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) 制限酵素部位とNotI (Takara Shuzo Co., Ltd.) 制限酵素部位を両側に持ったcDNAを調製した。

【0074】

次に、cDNAを λ ファージクローニングベクター λ ExCell NotI/EcoRI/CIP (Amersham Pharmacia Biotech K.K.) に挿入し、Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) を用いて、in vitroパッケージングを行った。大腸菌NM522 (Stratagene) を宿主としてプラーク数を寒天培地上で数えて力価を測定すると、 1.37×10^6 pfuであった。更に、大腸菌NM522を宿主として、ライブラリー増幅を行い、 6.9×10^{10} pfu/mlのS6細胞cDNAライブラリーを得た。S6細胞cDNAライブラリーの平均挿入サイズは1.0 kbであった。

【0075】

(2) PCRによるヒト非筋型コフィリンcDNAの完全長クローニング

胎盤由来ヒト非筋型コフィリンのアミノ酸配列をコードする塩基配列 (AC: D00682、501 bp) を基にそれぞれオリゴマーSK013 (図2の1~26に対応、プライマーSK013: SEQ ID NO: 3) およびSK014 (図2の476~501に対応、プライマーSK014: SEQ ID NO: 4) を合成した:

プライマーSK013 5'-ATGGCCTCCGGTGTGGCTGTCTCTGA-3' (SEQ ID NO: 3);

プライマーSK014 5'-TCACAAAGGCTTGCCCTCCAGGGAGA-3' (SEQ ID NO: 4)。

【0076】

ヒト非筋型コフィリンcDNAは、上記S6細胞cDNAライブラリーを鋳型とし、プライマーSK013 (SEQ ID NO: 3) およびプライマーSK014 (SEQ ID NO: 4) をプライマーとして、Advantage 2 polymerase (クロンテック社) を用い、PCRにより増幅した。この増幅産物を、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン社) を用い、pCR-Blunt II-TOPOベクターにサブクローニングし、約500塩基対

のDNA断片を持つ陽性クローンを得た。陽性クローンについて、BigDye Terminator Cycle Kit (アプライドシステムズ社) を用い、ABI PRISM 310 (アプライドバイオシステムズ社) により塩基配列解析を行った結果、501塩基対の非筋型コフィリンcDNA完全長の取得を確認した。なお、胎盤由来ヒト非筋型コフィリンcDNAの塩基配列と比較して、S6細胞由来のものは2塩基異なっていたが、いずれもアミノ酸の変異を伴っていなかった (図3)。

【0077】

(3) ヒト非筋型コフィリンcDNAの発現ベクターの作製

非筋型コフィリンcDNAクローンとpKDEMSSベクター (Kitano K, Fukuda Y, Nagahira K, Nasu T, Izumi R, Kawashima K, Nakanishi T Immunol. Lett. 47, 215-222, 1995) 由来pDEベクターを、EcoR Iで消化後、アルカリホスファターゼ (Takara Shuzo Co., Ltd.) により脱リン酸化した。その後、非筋型コフィリンcDNAを含むEcoR I断片とpDEベクターDNA断片をアガロースゲル電気泳動後、DNAを含むゲルを切り出し、CONCERT Rapid Gel Extraction System (Invitrogen) により精製した。DNA Ligation Kit (Takara Shuzo Co., Ltd.) を用い、非筋型コフィリンcDNA断片をpDEベクターDNA断片に挿入し、大腸菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.) を形質転換することにより、ヒト非筋型コフィリンcDNAの発現ベクターを調製した。なお、発現ベクターに挿入されたヒト非筋型コフィリンcDNAが発現用プロモーターに対して順方向であることは、制限酵素によって確認した。

【0078】

(4) ヒト非筋型コフィリンのCOS-1細胞における発現

組換え型ヒト非筋型コフィリンを、以下の手順により、発現させ、その発現を確認した。

【0079】

ヒト非筋型コフィリンのCOS-1細胞における発現

ヒト非筋型コフィリンcDNA発現ベクターを用いて、ヒト非筋型コフィリンを動物細胞で発現させ、発現したタンパク質にHPP-CFC活性があるか否かを検討した。発現用動物細胞としてCOS-1細胞 (理化学研究所から購入) を用い、リポフェクティン法によりヒト非筋型コフィリンcDNA発現ベクターをトランスフェクション

した。すなわち、直径10 cmの培養用ディッシュ (Corning, 430167) にCOS-1細胞を 1×10^6 細胞を植え込んだ。培地は、10%ウシ胎児血清を含むDulbeccoの最小必須培地 (DMEM、NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD) を用いた。翌日、Opti-MEM I 培地 (Invitrogen) 5 mlで細胞を1回リンスした後、5 mlのOpti-MEM I培地を加え、37℃で2時間培養した。2時間培養後、ディッシュ1枚あたり、実施例2 (3) で作製した発現プラスミド $1 \mu\text{g}$ およびリポフェクチン (Invitrogen) $10 \mu\text{g}$ の混液を加え、さらに、37℃で5時間培養した。培養後、Opti-MEM培地を5 ml加え、合計10 mlとし、5%CO₂存在下、37℃で72時間培養した。72時間培養後、遠心操作により培養上清を回収した。陰性対照として、ヒト非筋型コフィリンを挿入していないもとの発現ベクターを用い、同様に調製した。

【0080】

分泌型の組換え型ヒト非筋型コフィリンの検出

培養上清についてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析したところ、ヒト非筋型コフィリンcDNA発現ベクターをトランスフェクションした培養上清には、組換え型ヒト非筋型コフィリンと考えられる20 kDaのバンドが有意に認められた。この20 kDaのバンドは、ウェスタンブロット分析で、ラビット抗ヒト非筋型コフィリンペプチド (13~22) ポリクローナル抗体 (サイトスケルトン社) と特異的に反応した。したがって、組換え型ヒト非筋型コフィリンを分泌していることが確認された。ウェスタンブロット分析およびSDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析により、分泌型の組換え型ヒト非筋型コフィリンの発現量は、1 mlあたり $2.5 \mu\text{g}$ であることを確認した。

【0081】

分泌型の天然型ヒト非筋型コフィリンの検出

ヒト非筋型コフィリンを挿入していないもとの発現ベクター (pDEベクター) をトランスフェクションした培養上清を、10%トリクロル酢酸により沈殿後、100倍量用いて、同様にウェスタンブロット分析した場合、天然型ヒト非筋型コフィリンの微弱なバンドを検出した。以上のことから、従来細胞内にのみ存在していると考えられてきた非筋型コフィリンが、分泌型としてもわずかながら存在することも判明した。

【0082】

実施例3：組換え型ヒト非筋型コフィリンの造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質としての活性確認

COS-1細胞で発現した分泌型の組換え型ヒト非筋型コフィリンが、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質であるか否かを評価するため、培養上清について、HPP-CFCアッセイを行った。

【0083】

マウスBDF1（メス、10～15週齢、日本チャールス・リバーより購入）に抗がん剤である5-フルオロウラシルを（150 mg/kg、i.v.）（KYOWA HAKKO KOGYO Co., Ltd）を投与した後、2日後のマウスの大腿骨から、骨髓細胞を採取した。採取した骨髓細胞をラット抗マウスCD4抗体（CALTAG）、CD8抗体（CALTAG）、B220抗体（CEDERLANE）、Gr-1抗体（CEDERLANE）、Mac-1抗体（CALTAG）で標識した。これらラット抗体はすべてIgGを使用した。次にヤギ抗ラットIgG抗体標識ダイナビーズ（DYNAL）を反応させた後、マグネットを用いてダイナビーズと結合した細胞を除去することにより、系譜マーカー（Lineage marker）陰性な骨髓細胞（Lin-BMCs）を得た。これを、造血幹細胞画分としてHPP-CPCアッセイに用いた。

【0084】

得られた造血幹細胞画分を、10%FCS添加 α MEM培地で 2.5×10^4 細胞/mlに調整した。この細胞浮遊液にマウスIL-3（最終濃度10 ng/ml）を添加後、24ウェル培養プレート（Corning）のそれぞれのウェル中に1 mlずつまき、さらに各ウェルにサンプルまたはサイトカインを添加して液体培養し、その培養液の一部をコロニーアッセイに供することにより形成される巨大なHPP-CFCコロニー数を測定することによりHPP-CFC活性の測定を行う。

【0085】

組換え型ヒト非筋型コフィリンは、陰性対照と比較して、液体培養6日目より10日目で活性上昇傾向を示す本因子特有のHPP-CFC活性を、有意に濃度依存的に示した（図4）。活性が認められた濃度はコフィリンとして2.5 ng/ml程度（図中Cofilin3と表記）以上で、SCF 1 ng/ml（図中SCF1と表記）と同等であった。陰性対照の培養上清に分泌型の天然型ヒト非筋型コフィリンが確認されており、HP



P-CFC活性に若干関与していることが示唆された(図4)。

【0086】

以上の過程を経て、低分子量アクチン調節タンパク質として周知のヒト非筋型コフィリンが、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進活性を有する物質として作用することを見いだした。

【0087】

【発明の効果】

本発明は、コフィリンを有効成分とする、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を提供することにより、増殖および／または分化の段階が非常に早い造血幹細胞および／または造血前駆細胞を活性化することができる、という効果を有する。このような増殖および／または分化の段階が非常に早いこれらの細胞を活性化することはすなわち、幅広いセットの血液細胞の増殖および／または分化を促進することにつながり、たとえば再生医療の分野において効率よく血液系細胞の再生を図ることが可能になる。

【0088】

【配列表】

<110> サントリー株式会社

株式会社サントリー生物医学研究所

<120> 造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤

<130> 012986

<160> 4

<200> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> Human

<223> Amino acid sequence of human Cofilin.

<400> 1

Met	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Val	Phe	Asn
				5					10					15	
Asp	Met	Lys	Val	Arg	Lys	Ser	Ser	Thr	Pro	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Arg
			20					25					30		
Lys	Lys	Ala	Val	Leu	Phe	Cys	Leu	Ser	Glu	Asp	Lys	Lys	Asn	Ile	Ile
		35					40					45			
Leu	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile	Leu	Val	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Thr	Val
		50				55				60					
Asp	Asp	Pro	Tyr	Ala	Thr	Phe	Val	Lys	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Asp	Cys
	65				70				75				80		
Arg	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Asp	Ala	Thr	Tyr	Glu	Thr	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys
			85					90					95		
Glu	Asp	Leu	Val	Phe	Ile	Phe	Trp	Ala	Pro	Glu	Ser	Ala	Pro	Leu	Lys
		100					105					110			
Ser	Lys	Met	Ile	Tyr	Ala	Ser	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Lys	Lys	Lys	Leu
		115					120					125			
Thr	Gly	Ile	Lys	His	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Cys	Tyr	Glu	Glu	Val	Lys
		130				135					140				
Asp	Arg	Cys	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Val	Ile	Ser
	145				150				155				160		
Leu	Glu	Gly	Lys	Pro	Leu										
					165										

<200> 2

<211> 501

<212> DNA

<213> Human

<223> Nucleotide sequence of human Cofilin.

<400> 2

```
atggcctccg gtgtggctgt ctctgatggt gtcacaaagg tgttcaacga catgaagggtg 60
cgtaagtctt caacgccaga ggaggtgaag aagcgcaaga aggcggtgct cttctgcctg 120
agtgaggaca agaagaacat catcctggag gagggcaagg agatcctggt gggcgatgtg 180
ggccagactg tcgacgatcc ctacgccacc tttgtcaaga tgctgccaga taaggactgc 240
cgctatgccc tctatgatgc aacctatgag accaaggaga gcaagaagga ggatctgggtg 300
tttatcttct gggcccccca gtctgcgccc cttagagca aaatgattta tgccagctcc 360
aaggacgcca tcaagaagaa gctgacaggg atcaagcatg aattgcaagc aaactgctac 420
gaggaggtca aggaccgctg caccctggca gagaagctgg ggggcagtgc ggtcatctcc 480
ctggagggca agcctttgtg a 501
```

<200> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<223> Primer sequence for amplifying human Cofilin gene.

<400> 3

```
atggcctccg gtgtggctgt ctctga 25
```

<200> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<223> Primer sequence for amplifying human Cofilin gene.

<400> 4

tctccctgga gggcaagcct ttgtga

26

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ヒト非筋型コフィリン (AC:P23528) の一次構造配列を示す図である。

【図2】 図2は、ヒト胎盤非筋型コフィリン (AC:D00682) の cDNA の配列を示す図である。下線部分はプライマーとしてオリゴマー、プライマーSK013 (SEQ ID NO: 3) およびプライマーSK014 (SEQ ID NO: 4) を合成した部位を示す。

【図3】 図3は、ヒト胎盤由来 (上段) とヒトS6細胞由来 (下段) の非筋型コフィリンの塩基配列のアラインメントを示す。両者の比較から塩基198番および塩基471番が異なっているが、ともにサイレントミューテーションであることを示す。

【図4】 図4は組換え型ヒト非筋型コフィリンを発現させたCOS-1細胞の培養上清について、HPP-CFCアッセイにより、造血幹細胞増幅作用を評価した結果を示す。

1、2、3、4は×1、×10、×100、×1000倍希釈を示す。C1、C2はサンプルと同量のPBSを添加したウェルである。SCF1、5、10は1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/mlを示す。r hコフィリン濃度としてCofilin 1は250 ng/ml (培養上清を1/10量添加)、Cofilin 2は25 ng/ml、Cofilin 3は2.5 ng/ml、Cofilin 4は0.25 ng/mlである。データは液体培養6日目と10日目の各ウェルの培養液200 μl中のHPP-CFCコロニー数を示す。Inputは培養前の細胞浮遊液200 μl中のHPP-CFCコロニー数を示す。

【図 1】

MASGVAVSDG VIKVFNDMKV RKSSTPEEVK KRKKAVLFCL SEDKKNIILE EGKEILVGDV
GQTVDPPYAT FVKMLPKDC RYALYDATYE TKESKKEDLV FIFWAPESAP LKSKMIYASS
KDAIKKKLTG IKHELQANCY EEVKDRCTLA EKLGGSAVIS LEGKPL

Met	<u>Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Asp Gly Val Ile Lys</u>	Val Phe Asn
	5	10 15
Asp Met Lys Val Arg Lys Ser Ser Thr Pro Glu Glu Val Lys Lys Arg		
	20	25 30
Lys Lys Ala Val Leu Phe Cys Leu Ser Glu Asp Lys Lys Asn Ile Ile		
	35	40 45
Leu Glu Glu Gly Lys Glu Ile Leu Val Gly Asp Val Gly Gln Thr Val		
	50	55 60
Asp Asp Pro Tyr Ala Thr Phe Val Lys Met Leu Pro Asp Lys Asp Cys		
65	70	75 80
Arg <u>Tyr Ala Leu Tyr Asp Ala Thr Tyr Glu Thr Lys</u>	Glu Ser Lys Lys	
	85	90 95
Glu Asp Leu Val Phe Ile Phe Trp Ala Pro Glu Ser Ala Pro Leu Lys		
	100	105 110
Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Ala Ile Lys Lys Lys Leu		
	115	120 125
Thr Gly Ile Lys His Glu Leu Gln Ala Asn Cys Tyr Glu Glu Val Lys		
	130	135 140
Asp Arg Cys Thr Leu Ala Glu Lys <u>Leu Gly Gly Ser Ala Val Ile Ser</u>		
145	150	155 160
<u>Leu Glu Gly Lys Pro Leu</u>		
	165	

【図 2】

ヒト胎盤非筋型コフィリン (AC: D00682) の cDNA

atggcctccg gtgtggcgtg ctcgtatggt gtcattcaagg tgttcaacga catgaaggig 60
cgtaagtcct caacgccaga ggaggigaag aagcgcaaga aggcggctgt cttctgacctg 120
agtgaggaca agaagaacat catcctggag gaggccaagg agatccctggt gggcgatgtg 180
ggccagactg tcgacgatcc ctacgccacc ttgttcaaga tgcctgccaga taaggactgc 240
cgctatgccc tctatgaatgc aacctatgag accaaggaga gcaagaagga ggatctggig 300
tttatcttct gggcccccca gtctgcgccc ctttaagagca aaatgattta tgcagctcc 360
aaggacgcca tcaagaagaa gctgacaggg atcaagcatg aatlgcaagc aaactgctac 420
gaggaggica aggaccgtct caccctggca gagaagctgg ggggcagtgc ggtcatctcc 480
ctggagggca agcctttgtg a 501

下線部分は、プライマーとしてオリゴマーを合成した部位を示す。

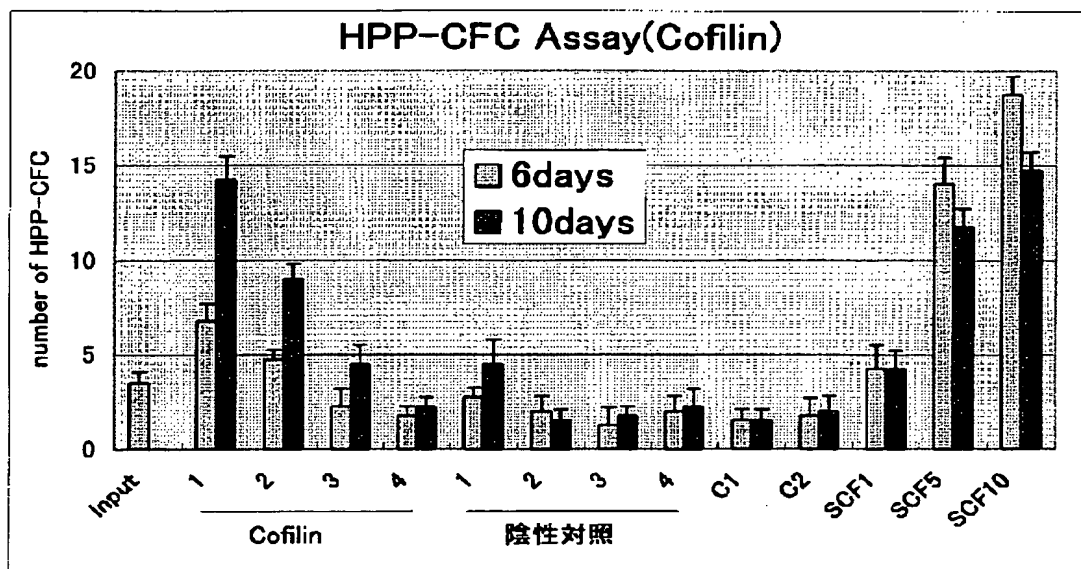
【図 3】

図 3 ヒト胎盤由来（上段）とヒト S6 細胞由来（下段）の
非筋型コフィリンの塩基配列のアライメント

胎盤 cDNA	1	10	20	30	40	50	
S6 cDNA	1	10	20	30	40	50	
胎盤 cDNA	51	60	70	80	90	100	
S6 cDNA	51	60	70	80	90	100	
胎盤 cDNA	101	110	120	130	140	150	
S6 cDNA	101	110	120	130	140	150	
胎盤 cDNA	151	160	170	180	190	200	
S6 cDNA	151	160	170	180	190	200	
胎盤 cDNA	201	210	220	230	240	250	
S6 cDNA	201	210	220	230	240	250	
胎盤 cDNA	251	260	270	280	290	300	
S6 cDNA	251	260	270	280	290	300	
胎盤 cDNA	301	310	320	330	340	350	
S6 cDNA	301	310	320	330	340	350	
胎盤 cDNA	351	360	370	380	390	400	
S6 cDNA	351	360	370	380	390	400	
胎盤 cDNA	401	410	420	430	440	450	
S6 cDNA	401	410	420	430	440	450	
胎盤 cDNA	451	460	470	480	490	500	
S6 cDNA	451	460	470	480	490	500	
胎盤 cDNA	501	510	520	530	540	550	
S6 cDNA	501	510	520	530	540	550	

両者で異なる 2 塩基をシャドーで表示、いずれもサイレントミューテーション

【図 4】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化が十分でないために生じる疾患、特に汎造血細胞減少症および／または造血機能低下を伴う疾患の治療薬として有用である、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明は、コフィリンを有効成分とする、造血幹細胞および／または造血前駆細胞の増殖および／または分化促進剤を提供することにより、上記課題を解決する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 1 - 4 0 0 3 3 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 9 0 4]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号

氏 名

サントリー株式会社

特願 2001-400330

出願人履歴情報

識別番号

[500422182]

1. 変更年月日

2000年 9月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

氏 名

株式会社サントリー生物医学研究所

2. 変更年月日

2003年 3月 17日

[変更理由]

名称変更

住 所

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

氏 名

株式会社第一サントリー生物医学研究所